

Regulation of eotaxin-3/CC chemokine ligand 26 expression by T helper type 2 cytokines in human colonic myofibroblasts.

著者	高橋 憲一郎
発行年	2015-03-10
その他の言語のタイトル	ヒト大腸筋線維芽細胞からのTh2サイトカインによるエオタキシン-3/CCL-26の発現誘導 ヒト ダイチョウキン センイガ サイボウ カラノ Th2 サイトカイン ニ ヨル エオタキシン-3/CCL-26 ノ ハツゲン ユウドウ
URL	http://hdl.handle.net/10422/10231

氏 名	高橋 憲一郎
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 甲第724号
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
学 位 授 与 年 月 日	平成27年 3月10日
学 位 論 文 題 目	Regulation of eotaxin-3/CC chemokine ligand 26 expression by T helper type 2 cytokines in human colonic myofibroblasts. (ヒト大腸筋線維芽細胞からの Th2 サイトカインによるエオタキシン-3 /CCL-26 の発現誘導)
審 査 委 員	主査 教授 杉原 洋行 副査 教授 河内 明宏 副査 教授 後藤 敏

論文内容要旨

※整理番号	730	氏名 (ふりがな)	たかはし けんいちろう 高橋 憲一郎
学位論文題目	Regulation of eotaxin-3/CC chemokine ligand 26 expression by T helper type 2 cytokines in human colonic myofibroblasts (ヒト大腸筋線維芽細胞からの Th2 サイトカインによるエオタキシン-3 /CCL-26 の発現誘導)		
<p>・研究の目的</p> <p>炎症性腸疾患 (IBD) 患者の腸管粘膜における好酸球の増加が以前より指摘されている。また、IBD 患者の血中および便中には好酸球由来のタンパクが増加している事が報告されている。そこで、好酸球遊走因子である eotaxin-3 / CC chemokine ligand (CCL)-26 に着目し、大腸粘膜における eotaxin-3 の発現や発現のメカニズムについて検討した。</p> <p>・方法</p> <p>IBD 患者と健常人の大腸粘膜生検検体における eotaxin-3 の mRNA の発現を Real time PCR 法にて比較検討した。また、大腸上皮筋線維芽細胞と大腸上皮細胞株 (HT-29、Caco-2) での eotaxin-3 の発現を Real time PCR 法、ELISA 法、免疫染色を用いて測定した。発現に関わるシグナル伝達についてはウェスタンブロット法や small interfering RNA (siRNA) を用いたシグナル伝達因子のノックダウンを用いて検討した。</p> <p>・結果</p> <p>活動期の IBD の大腸生検検体、特に活動期潰瘍性大腸炎において eotaxin-3 の mRNA が有意に発現亢進していた。一方、非活動期の IBD 粘膜では有意な発現の亢進は見られなかった。</p> <p>次に大腸上皮筋線維芽細胞 (以下、筋線維芽細胞) を 11 種類のリガンドで刺激したところ、2 型ヘルパー T 細胞 (Th2) サイトカインである Interleukin (IL)-4 又は IL-13 の刺激により eotaxin-3 の遺伝子発現が誘導された。同様の刺激で eotaxin-3 タンパクが細胞質内に発現していることを免疫染色にて確認した。大腸上皮細胞株の HT-29 と Caco-2 を同様に IL-4 又は IL-13 で刺激したところ eotaxin-3 の遺伝子発現は誘導されたが、いずれも発現量が筋線維芽細胞に比べて少なかった。以下の実験は全て筋線維芽細胞を用いて行った。</p> <p>細胞実験での結果を踏まえて、生検検体における eotaxin-3 と IL-4 及び IL-13 の mRNA 発現量を検討した。その結果、eotaxin-3 と IL-4 の発現に有意な正の相関関係が見られた。</p> <p>IL-4/IL-13 は Signal transducers and activator of transcription (STAT)6 を介して機能を果たす。そこで、筋線維芽細胞を IL-4 又は IL-13 で刺激したところ、STAT6 のリン酸化が確認できた。次に siRNA を用いて筋線維芽細胞の STAT6 をノックダウンしたところ、IL-4 又は IL-13 刺激による eotaxin-3 の発現は有意に低下した。</p>			

IL-4/IL-13-STAT6 経路は Suppressor of cytokine signaling (SOCS)-1, 3, 5 により抑制されることが報告されている。そこで、SOCS-1, 3, 5 を siRNA で各々ノックダウンし IL-4 又は IL-13 で刺激を行ったところ、SOCS-1 をノックダウンした群で eotaxin-3 が最も高発現した。

Th2 サイトカインにより eotaxin-3 の発現が誘導されることから、今度は Th1 サイトカインである IFN- γ を IL-4 又は IL-13 に加えて同時刺激を行った。その結果、IFN- γ 濃度依存的に eotaxin-3 の発現が抑制された。IFN- γ で予め刺激を行った後に IL-4 又は IL-13 刺激を行ったところ、STAT6 のリン酸化は抑制されていた。

STAT1 は IFN- γ のシグナル伝達において中心的役割を果たす。そこで siRNA を用いて STAT1 をノックダウンしたところ、IFN- γ による eotaxin-3 の発現抑制効果はほとんど消失した。

・考察

IBD 患者の粘膜では好酸球が増加しているが、今回の研究で活動期の IBD 患者粘膜中には好酸球遊走因子である eotaxin-3 が高発現していた。Eotaxin-3 は活動期の IBD 粘膜における好酸球の誘導に関わっていると考えられる。また筋線維芽細胞は Eotaxin-3 を高産生することが分かり、IBD の病態における好酸球誘導に筋線維芽細胞が大きく関わる可能性が示唆される。

Eotaxin-3 発現の機序については、Th2 サイトカインである IL-4 又は IL-13 刺激が eotaxin-3 産生のキーとなっている。生検検体を用いた解析においても IL-4 と eotaxin-3 の mRNA の発現に正の相関が得られた。IL-4・IL-13 による eotaxin-3 の発現は、STAT6 リン酸化を介したシグナル伝達により誘導され、ネガティブレギュレーションに関しては SOCS-1 が最も重要である。一方、Th1 サイトカインである IFN- γ は IL-4 又は IL-13 による eotaxin-3 の発現誘導に対して抑制的に働くことが分かった。この抑制効果は STAT1 を介し、IL-4・IL-13 による STAT6 リン酸化を抑制することによるものであった。

・結論

活動期の潰瘍性大腸炎・クローン病の粘膜、特に IL-4 が多く発現している環境において eotaxin-3 は発現亢進している。大腸上皮筋線維芽細胞は IL-4 刺激により STAT6 のリン酸化を介し多くの eotaxin-3 を誘導し、好酸球を腸管粘膜に遊走させていると考えられる。逆に SOCS-1 は eotaxin-3 の誘導においてネガティブレギュレーションを行い、また IFN- γ は STAT1 を介し eotaxin-3 の発現を抑制していると考えられる。

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

学位論文審査の結果の要旨

整 理 番 号	7 3 0	氏 名	高橋 憲一郎
論 文 審 査 委 員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) (明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと。)</p> <p>炎症性腸疾患 (IBD) の腸粘膜における好酸球浸潤の意義を調べるために、好酸球遊走因子である eotaxin-3 に着目し、大腸生検検体、大腸上皮下線維芽細胞および大腸癌細胞株を用いて、eotaxin-3 の発現レベルと、発現調節にかかわるシグナル伝達系の分子機構について検討を行い、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Eotaxin-3 mRNA 発現は、潰瘍性大腸炎 (UC) の活動期、クローン病 (CD) の活動期で上昇したが、その程度は UC の方が CD より有意に高く、非活動期では上昇しなかった。 2) Eotaxin-3 mRNA と蛋白の発現は、培養筋線維芽細胞を IL-4、IL-13 で刺激することによって上昇したが、その反応は Stat6 のリン酸化を介したシグナル伝達によって誘導され、SOCS-1 によって抑制された。 3) この Th2 サイトカインによる Eotaxin-3 の誘導は、Th1 サイトカインである IFN-γ で抑制され、この抑制は Stat1 のノックダウンによってほぼ消失した。 <p>本論文は、好酸球遊走因子 eotaxin-3 の発現の IBD の活動度との関係と、その発現制御の分子機構について、新しい知見を与えたものであり、最終試験として論文内容に関連した試問を受け合格したので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 552 字)</p> <p style="text-align: right;">(平成 27 年 1 月 28 日)</p>			